UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

337

PIERO GAMBOGI

Intorno alla utilizzazione di alcuni aminoacidi da parte di *Pseudomonas savastanoi* (Smith) Stevens

Estratto dagli *Annali Sperimentazione Agraria*
1956

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
6 FEB 1957

ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E MICROBIOLOGIA AGRARIA
DELL'UNIVERSITÀ
E
OSSERVATORIO FITOPATOLOGICO
(SEZIONE DI PATOLOGIA VEGETALE)
(Direttore: Onorato Verona)
PISA

PIERO GAMBOGI

INTORNO ALLA UTILIZZAZIONE DI ALCUNI AMINOACIDI DA PARTE DI *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* (SMITH) STEVENS

Nell'ambito dei batteri fitopatogeni producenti neoplasie *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Town.) Conn è, senza dubbio, il meglio studiato. Così non è nei riguardi di *Pseudomonas savastanoi* (Sm.) St. nonostante questa specie presenti pari interesse se non altro per la sua grande importanza economica.

Ciò giustifica le ricerche che su *Ps. savastanoi* sono state iniziate in questo Istituto per suggerimento del direttore prof. O. Verona * e, in conseguenza, la presente prima Nota dove brevemente si riferisce intorno al comportamento che *Ps. savastanoi* presenta di fronte ad alcuni aminoacidi.

L'argomento è stato riconosciuto di un certo interesse anche generale giacchè, come accennato in altro lavoro eseguito nello stesso Istituto **, non abbiamo molte notizie circa i rapporti che si stabiliscono tra aminoacidi e germi fitopatogeni; mentre è intravisto un certo ruolo, da parte degli stessi aminoacidi, nei riguardi della suscettibilità o della resistenza delle piante alle malattie.

In questo primo contributo si è inteso stabilire:

1) se i più comuni aminoacidi vengono utilizzati come sorgente azotata;

2) se i medesimi possono costituire ad un tempo sorgente di azoto e di carbonio;

---

* Ringrazio vivamente il prof. O. Verona per i consigli di cui mi è stato prodigo nell'esecuzione del presente lavoro.

** TREGGI, G. Azione di alcuni aminoacidi su *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Town.) Conn. *Annali della Sperimentazione Agraria*, 1952, n. s., vol. VI, p. 1416.

3) in analogia a quanto è noto, se vi sono aminoacidi capaci di azione antibatterica;

4) se la coltura ripetuta in mezzi contenenti aminoacidi induceva modificazioni nella virulenza del germe.

1. — Per quanto si riferisce all'utilizzazione degli aminoacidi come sorgente azotata si è fatto uso del seguente substrato base:

acqua	100
glucosio	1
Na_2HPO_4	0,1
$Mg\ SO_4$	0,1
KCl	0,1

Ad esso furono aggiunti gli aminoacidi nelle quantità dello 0,1-0,25-0,5-1 %; quantità doppie per quelli in forma dl.

Dopo sterilizzazione, semina e incubazione in termostato a 26° C, al 10° giorno di coltura lo sviluppo fu apprezzato fotometricamente annotando peraltro i risultati con i segni — in caso negativo, +/++++ in caso positivo.

Tali risultati figurano nella tabella I.

TABELLA I. - **Utilizzazione di aminoacidi come sorgente azotata da parte di *Ps. savastanoi***

Aminoacido	Quantità di aminoacido presenti nel mezzo			
	0,1 %	0,25 %	0,5 %	1 %
glicina	++	++	+	±
l-leucina	++++	++++	++++	+++
dl-isoleucina	+++	++	+	±
istidina	++++	+++	+++	++
l-arginina	++++	++++	+++	+++
cisteina	+	—	—	—
dl-metionina	—	—	—	—
ac. aminovalerianico	+	—	—	—
l-triptofano	++++	+++	+++	+++
dl-triptofano	—	—	—	—
creatina	+	+	+	+
dl-treonina	++	+	±	—
lisina	+++	+++	++	++
dl-serina	+++	+++	++	++
dl-valina	+	+	—	—
Na-glutammato	++++	++++	++++	++++
l-alanina	++++	++++	+++	+++
cistina	+	+	+	+
l-tirosina	+	+	+	+
istamina	—	—	—	—

Considerando gli sviluppi avuti nella serie contenente più bassa concentrazione (0,1 %) di aminoacido o più alta concentrazione (1 %) si ebbe dunque:

In presenza dello 0,1 % di aminoacido sviluppo:

Buono o quasi	Mediocre	Scarso	Nullo
l-leucina *	glicina *	ac. aminovalerianico	dl-metionina
istidina *	dl-treonina	creatina	dl-triptofano *
l-arginina		dl-valina *	istamina *
l-triptofano *		cistina	
Na-glutammato *		l-tirosina	
lisina		cisteina	
dl-serina *			
l-alanina			
dl-isoleucina			

In presenza dell'1 % di aminoacido sviluppo:

Buono o quasi	Mediocre	Scarso	Nullo
Na-glutammato *	istidina *	creatina	glicina *
l-triptofano	lisina	cistina	dl-isoleucina
l-arginina	dl-serina	l-tirosina	dl-metionina *
l-leucina			dl-valina
l-alanina			ac. aminovalerianico *
			dl-triptofano *
			dl-treonina *
			istamina *
			cisteina

Ne risulta che alcuni aminoacidi sono bene utilizzati come sorgente azotata; altri lo sono se presenti in moderate quantità; altri, infine, non dimostrano di essere utilizzati.

Ciò stabilito, era logico seguire la utilizzazione dei primi in comparazione con altre sorgenti azotate quali asparagina, solfato ammonico e nitrato di potassio.

Con il solito mezzo base sono state quindi preparate le conseguenti colture aggiungendo i varî composti azotati (asparagina, aminoacidi, sali minerali) in quantità tali da avere nel mezzo lo 0,025 % di azoto. Incubazione a 26° C e lettura periodica dell'intensità di sviluppo a mezzo di elettrofotometro.

I risultati figurano nella tabella II.

Si osserva che l'azoto sotto forma aminica ed anche amidica consente (nei composti usati) uno sviluppo di *Ps. savastanoi* molto migliore di quello offerto dall'azoto sotto forma minerale. Fa solo eccezione, tra gli aminoacidi sperimentati, l-triptofano.

---

* L'asterisco indica che uguale risposta si ebbe con *Agr. tumefaciens*: cfr. lav. cit.

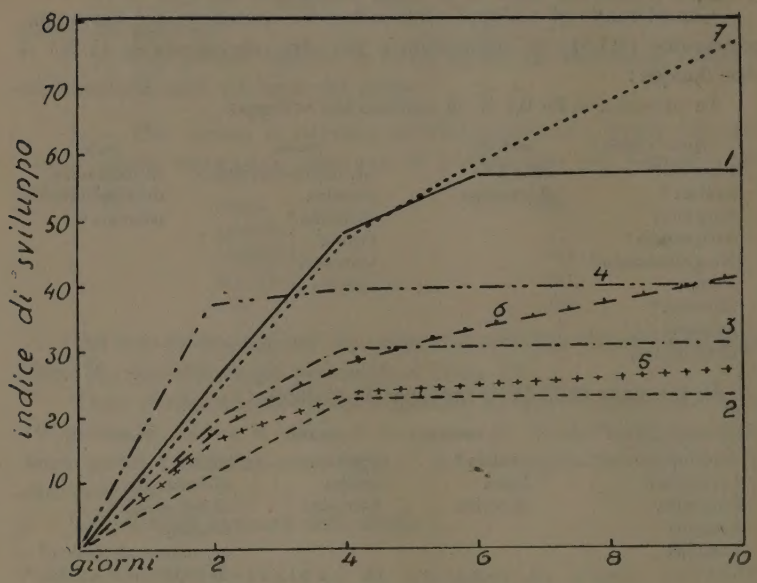


FIG. 1. – Sviluppo di *Ps. savastanoi* in presenza di:

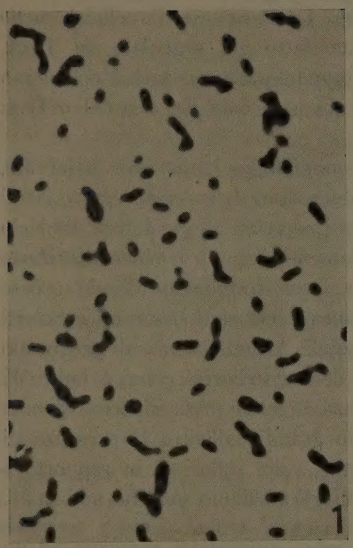
1 – asparagina
2 – nitrato di sodio
3 – solfato ammonico
4 – Na–glutammato
5 – l–triptofano
6 – leucina
7 – l–alanina

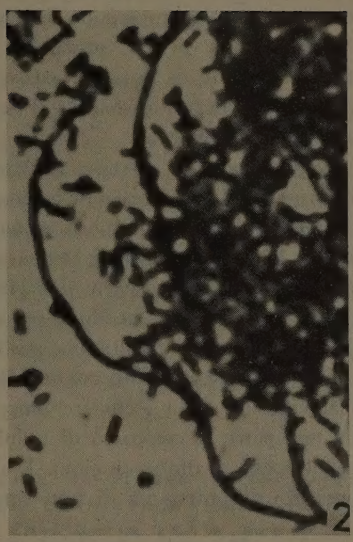
TABELLA II. **- Sviluppo di *Ps. savastanoi* in mezzi alimentari contenenti varie sorgenti di azoto**

Sorgente di azoto	Indice di sviluppo rilevato all'elettrofotometro dopo giorni				
	2	4	6	8	10
asparagina	25	51	57	57	57
Na–nitrato	11	22	22 *	22	22
solfato ammonico . . .	20 *	31	31	31	31
Na–glutammato	38	39	39 *	39	39
l–triptofano	18	22	23	24	25
leucina	19	27	34	37	40 *
l–alanina	16	47 *	58	66	75

(Il segno * indica comparsa di velo alla superficie della coltura).

Circa l'aspetto colturale dobbiamo notare la formazione alla superficie dei liquidi, in molti casi, di una sottile pellicola (cfr. tabella II al segno *).





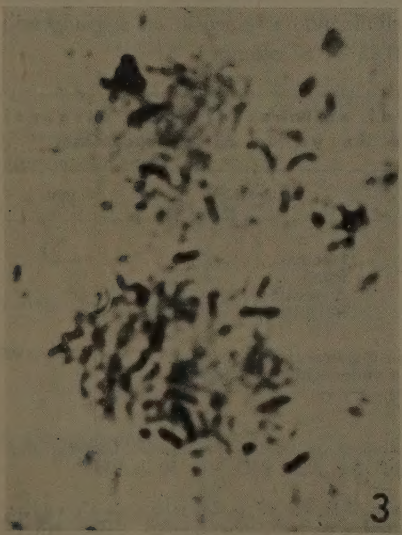


FIG. 2. — Aspetti morfologici di *Ps. savastanoi* coltivato in assenza di aminoacidi (1) oppure in presenza di arginina (2) e di istidina (3).

Talvolta essa è apparsa quasi all'inizio della coltura (solfato ammonico), talaltra molto più tardi (leucina). La comparsa di pellicola nelle colture liquide di *Ps. savastanoi* è un fatto già segnalato da J. A. Pinckard * e da questi discusso in rapporto alle variazioni nel mezzo del pH e soprattutto dell'rH il quale ultimo (come del resto il pH) si abbassa notevolmente.

Per quanto si riferisce all'aspetto morfologico sono state osservate, in presenza di qualche aminoacido, modificazioni di un certo rilievo e tali da mettersi forse in rapporto ai noti fatti correlati allo stabilirsi del ciclo « L ». Non di rado è così comparsa filamentosità, più o meno manifesta (per esempio in presenza di arginina), come formazione di più grosse cellule; in altri casi (istidina, per esempio) sono stati osservati ammassi di cellule delle quali moltissime poco tingibili. Alcuni aminoacidi provocano quindi un rallentamento od un blocco della citodieresi come è indice la filamentosità senza escludere l'insorgenza di altri processi come denota da una parte la comparsa di cellule più grandi dall'altra la presenza di cellule poco o affatto tingibili. D'altronde, sullo stabilirsi, in rapporto a presenza di aminoacidi di fatti consimili già abbiamo qualche notizia **.

2. — Per vedere se alcuni dei ricordati aminoacidi potevano ad un tempo fornire sorgente di azoto e di carbonio si è fatto uso del liquido base prima ricordato eliminando il glucosio ed aggiungendo l'aminoacido in quantità pari allo 0,25 %. Si ottenne:

TABELLA III. - **Utilizzazione di aminoacidi come sorgenti di azoto e di carbonio da parte di *Ps. savastanoi***

Aminoacido	Sviluppo	Aminoacido	Sviluppo
l-alanina	+	leucina	++
arginina	+	lisina	+
cisteina	—	dl-serina	+
istidina	+	l-triptofano	+
Na-glutammato	+		
Controlli	senza carbonio e sanza azoto — con glucosio e aminoacidi (vedi tabella I)		

* Pinckard, J. A. Physiological studies of several pathogenic bacteria that induce cell stimulation in plants. *Journ. of Agr. Res.*, 1945, Vol. 50, p. 933.

** Veggasi:

Vacirca, F. *Boll. Ist. Sier. Milanese*, 1948, vol. 27, p. 231 (citato da Cavallo, G., e D'Onofrio, F. Polimorfismo batterico da trietilenmelammina. *Giorn. Microbiol.*, 1955, vol. 1, p. 115).

Dienes, L., Weinberger, H. J., and Madoff, S. The transformation of typhoid bacilli into L forms under various conditions. *Journ. Bact.*, 1950, Vol. 59, p. 755.

Evidentemente, per quanto dicono i risultati della tabella III gli aminoacidi non sembrano bene utilizzati come sorgente di carbonio.

3. — In rapporto a quanto è noto circa il potere antibatterico di alcuni aminoacidi qualche ricerca è stata eseguita anche a questo riguardo.

Si è fatto uso del terreno sintetico di Sahyun addizionato di quantità diverse di uno dei seguenti aminoacidi: ac. aminovalerianico, dl-valina, cisteina, ac. p-aminobenzoico, dl-triptofano. Essendo nota, nelle manifestazioni antibatteriche di alcuni composti, una influenza della carica batterica d'inoculo, l'esperienza è stata realizzata allestendo per ogni aminoacido ed ogni concentrazione una serie di cinque provette da inficiarsi con dosi decrescenti di inoculum. Questo era rappresentato da una dispersione omogenea, in acqua sterile, di patine batteriche di 48 ore sviluppate a 26° C su agar fagioli saccarosato. Incubazione a 26° C e lettura dell'eventuale sviluppo al 10° giorno. Risultò:

TABELLA IV. **- Azione antibatterica di alcuni aminoacidi (nelle provette 1-5 differente quantità di inoculo in misura decrescente a partire da I nella quale provetta l'inoculo è massimo)**

Aminoacido		Numero delle provette				
		1	2	3	4	5
controllo (senza aminoacidi)		++++	++++	++++	++++	++++
ac. aminovalerianico:						
	0,1 ‰	+++	+++	+++	++	++
	0,25 »	++	++	++	++	++
	0,50 »	++	++	++	++	++
	1 »	+	+	+	+	±
	2 »	+	+	±	—	—
	3 »	—	—	—	—	±
dl-valina	0,1 ‰	++++	++++	++++	++++	++++
	3 »	++++	++++	++++	++++	++++
cisteina	0,1 ‰	++++	++++	++++	++++	++++
	0,5 »	++++	++++	+++	+++	+++
	1 »	+++	+++	++	++	++
	3 »	+	+	+	+	—
ac. p-aminobenzoico:						
	0,1 ‰	+++	+++	+++	+++	+++
	0,5 »	+++	+++	++	++	+
	1 »	—	—	—	—	—
dl-triptofano	0,1 ‰	++++	++++	++++	++++	++++
	0,25 »	++++	++++	++++	++++	++++
	0,5 »	++++	+++	+++	+++	+++
	2 »	++	++	++	+	+
	3 »	++	+	+	+	±

Appare dunque che l'ac. p-aminobenzoico, l'ac. aminovalerianico, la cisteina e, in minor misura, il dl-triptofano, esercitano, in rapporto alla dose, una qualche azione di freno sullo sviluppo di *Ps. savastanoi*.

È noto che pari azioni di freno si hanno anche verso altri germi.

4. — Come ultima ricerca si è voluto osservare se, in analogia a quanto è noto per *Agrobact. tumefaciens* anche *Ps. savastanoi* attenua, se coltivato in presenza di aminoacidi, la propria virulenza.

A questo scopo sono state allestite colture in agar-fagioli saccarosato presenti alcuni aminoacidi (Na-glutammato, l-triptofano, arginina, leucina, istidina) nella dose relativamente forte dell'1 %.

Dobbiamo notare che lo sviluppo è stato più o meno regolare in presenza di tutti i ricordati aminoacidi, ad esclusione dell'istidina: nel primo, come nei successivi passaggi. In presenza di istidina lo sviluppo è venuto a mancare dopo pochi passaggi.

Qui non interessava seguire l'eventuale insorgere di modificazioni colturali o morfologiche. Con tutto ciò è il caso di dire come, morfologicamente, si siano ripetuti gli stessi quadri osservati nei mezzi liquidi, mentre colturalmente dobbiamo ricordare il comparire di un pigmento bruno in presenza di l-triptofano e di leucina. Quest'ultimo fatto, con riferimento al triptofano, già è stato notato e studiato per *Agrobact. tumefaciens*. L'interpretazione biochimica che ne viene data probabilmente è da ritenersi valida anche per *Ps. savastanoi*.

Ebbene, con colture di 5° passaggio (di 2° passaggio con istidina) furono eseguite inoculazioni in giovani piante di olivo che scegliemmo di una varietà gentile e che furono sistemate e coltivate in vaso. Venti piantine per ogni prova.

L'inoculazione ebbe luogo nei primi giorni di maggio e fu eseguita effettuando dieci piccole punture lungo il fusto con ago robusto inficiato di patina microbica.

La comparsa della reazione neoplastica e lo sviluppo dei tessuti tumorali fu seguìta per 45 giorni. Al termine fu notato quanto segue:

L'infezione ebbe dunque luogo, con esito pari al 100 %, nelle inoculazioni eseguite con colture cresciute in agar normale privo di aminoacidi.

Nelle inoculazioni eseguite con colture cresciute in presenza di alcuni aminoacidi gli esiti furono invece diversi, le stesse colture dimostrandosi più o meno attenuate (Na-glutammato, arginina) od anche addirittura avirulentate (leucina, istidina). Inoculando con colture attenuate la comparsa della reazione neoplastica fu tarda e i tumori che si svilupparono furono piccoli e poco estesi.

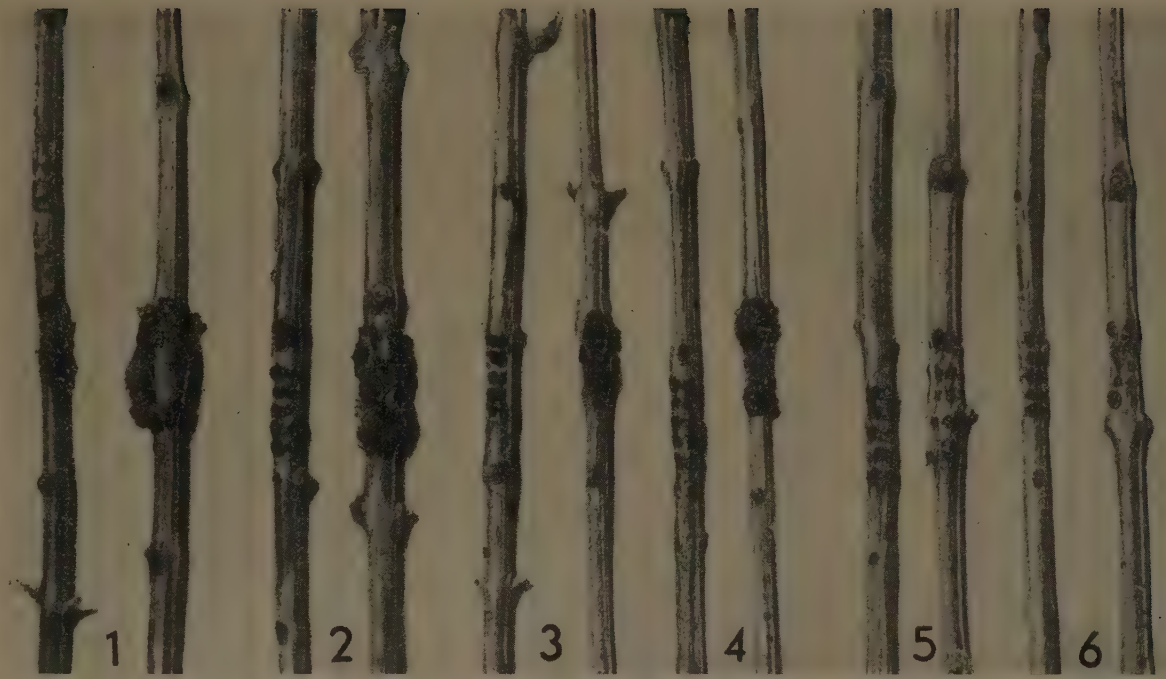


FIG. 3. – Esiti delle inoculazioni artificiali conseguiti impiegando colture cresciute in assenza di aminoacidi (1) o in presenza di l–triptofano (2), sodio–glutammato (3), arginina (4), leucina (5) e istidina (6).
Per ogni tesi sono fotografati due rametti rappresentativi: quello a sinistra mostra l'esito delle inoculazioni al 15° giorno, quello a destra al 45° giorno.

Tabella V. **- Sviluppo di tumori in giovani piante di olivo a seguito di inoculazioni sperimentali di *Ps. savastanoi* in un ceppo coltivato in assenza o in presenza di aminoacidi**

	Vari tipi di reazione (su 20 piante)				
	Esito negativo	Tumori appena accennati	Formazione di tumori lenta	Formazione di tumori abbastanza pronta	Formazione di tumori pronta
Punture asettiche (controllo 1°)	20	—	—	—	—
Con coltura cresciuta in assenza di aminoacidi (controllo 2°)	—	—	—	4	16
Con colture cresciute in presenza di:					
l–triptofano	—	—	—	18	2
Na–glutammato	—	—	3	17	—
arginina	—	—	7	13	—
leucina	17	3	—	—	—
istidina	20	—	—	—	—

RIASSUNTO

Nell'indagare il comportamento di *Pseudomonas savastanoi* (Sm.) St. di fronte ad alcuni aminoacidi è risultato quanto segue:

1) Alcuni aminoacidi, tra quelli sperimentati, sono bene utilizzati da *Ps. savastanoi* come sorgente alimentare azotata; altri lo sono nei limiti di determinate concentrazioni; altri infine non sembrano utilizzati.

2) Gli aminoacidi che risultano bene utilizzati consentono uno sviluppo di *Ps savastanoi* superiore a quello offerto dai sali ammonici e dai nitrati.

3) In presenza di alcuni aminoacidi spesso si stabiliscono variazioni colturali ed anche morfologiche; queste ultime, per un rallentamento o blocco della citodieresi, si manifestano con comparsa di filamentosità od anche con altre modificazioni che lasciano pensare possibile lo stabilirsi del ciclo « L ».

4) Se alcuni aminoacidi possono ritenersi buona sorgente di alimentazione azotata, non sembra che possano offrire pari buona sorgente di carbonio.

5) Come altre specie batteriche anche *Ps. savastanoi* è sensibile all'azione antibatterica (più o meno evidente secondo le dosi) di alcuni aminoacidi; particolarmente attivi l'acido aminovalerianico e l'ac. p-aminobenzoico.

6) *Ps savastanoi* coltivato in presenza di alcuni aminoacidi va incontro a processi di attenuazione, talvolta notevoli, della propria virulenza.